

Efeitos da Glicação sobre o Glioxalase II

Samuel Filipe da Graça Gilberto

Licenciado em Bioquímica pela Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

30 de Julho de 2009

Introdução

Existem várias doenças onde a glicação de proteínas está envolvida, donde se destacam a doença de Alzheimer e a diabetes mellitus. Esta reacção consiste na ligação irreversível de derivados sacarídeos às referidas macromoléculas. Como resultado da glicação, formam-se produtos avançados de glicação, usualmente abreviados para AGEs, apresentando-se como bastante tóxicos para as células. Um agente de glicação muito importante é o metilglioxal^{1,5}. Este é formado paralelamente à via glicolítica, através da eliminação do grupo fosforilo do fosfato de dihidroxiacetona. Cerca de 0,3% da glucose utilizada na via glicolítica acaba por levar à formação de metilglioxal. Em termos cinéticos, esta reacção de desfosforilação não necessita de catalisador dado às trioses de fosfato serem relativamente instáveis^{1,2}.

De forma a prevenir a glicação, a célula possui mecanismos adequados para degradar os 2-oxoaldeídos que podem levar à formação de AGEs, como por exemplo o metilglioxal³. Um desses mecanismos é a actuação do aldose redutase, que converte os 2-oxoaldeídos na forma de acetol. Por outro lado, o sistema dos glioxalases apresenta uma muito maior importância na remoção dos 2-oxoaldeídos. Este sistema é constituído pelos enzimas glioxalase I e glioxalase II, sendo que o glioxalase I isomeriza o hemitioacetal formado através da reacção não enzimática do glutathione com os 2-oxoaldeídos à forma de tioéster. O tioéster é então hidrolisado pelo glioxalase II em glutathione e no 2-hidroxiácido correspondente. Retomando o exemplo do metilglioxal, este dá origem a D-lactato quando catabolizado por este sistema^{2,3}.

O trabalho realizado permitiu ao aluno empregar toda uma série de técnicas utilizadas frequentemente em investigação na área de proteómica. Para além disso, foi também possível iniciar a implementação de um método inovador para análise de alterações à estrutura globular de uma proteína através de espectrometria de massa.

Resultados

1. Optimização de condições para sobreexpressão de proteínas em *E. coli* (estirpe BL21)

Qualquer estudo de uma proteína envolve, naturalmente, a sua purificação a partir de uma fonte viável e cuja expressão seja fácil e em quantidade suficientes para os estudos a prosseguir. No entanto, a extracção de proteína directamente do organismo que a produz requer um largo investimento, sendo a sua quantidade, na maioria das vezes, reduzida. Deste modo, encontraram-se outros métodos que permitem a obtenção de proteínas de forma mais abundante. O DNA codifica as proteínas produzidas por cada organismo. Deste modo, é possível introduzir fragmentos de DNA de um organismo (contendo uma o DNA que codifica a proteína que se pretende estudar inserido num “vector”) num outro organismo, tal como na bactéria *E. coli*, ou em levedura. Estes organismos conseguem produzir a proteína em estudo em larga escala, sendo que eles próprios proliferam abundantemente.

A transformação de leveduras, ou bactérias, permite assim obter uma fonte quase infindável de uma proteína desejada. O projecto envolveu a expressão da proteína em *E.coli* dado que a sua expressão e purificação neste organismo são bastante mais fáceis que em levedura (estudos realizados preliminarmente no grupo de enzimologia).

Numa primeira abordagem foi necessário optimizar as condições do meio para expressão de proteína em *E.coli*. Desta forma, inoculámos com *E.coli* um meio de cultura próprio (*Luria-Bertani broth*), variando as condições em que se proporcionou o crescimento das populações de bactéria, nomeadamente a temperatura e a concentração de IPTG (um indutor da expressão proteica). A expressão da proteína em causa foi acompanhada ao longo do tempo após separação das proteínas que constituem o proteoma de *E.coli* por SDS-PAGE, técnica essa descrita de seguida.

As proteínas presentes em qualquer mistura (neste caso, o conjunto de todas as proteínas produzidas por uma bactéria) podem ser separadas por diversos métodos. Em bioquímica, é bastante usual recorrer-se à electroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE, do Inglês *sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis*). Esta técnica confere a todas as proteínas uma carga fortemente negativa. Ao exercer o efeito de um campo eléctrico, estas migram em torno do pólo positivo, mas para tal necessitam de atravessar o gel de poliacrilamida. Este, exercendo crivo molecular, leva a que as proteínas de massa molecular inferior migrem mais rapidamente que as restantes, o que leva a que as proteínas se separem umas das outras dadas as suas distintas massas moleculares. É assim um óptimo método de determinar a presença de uma proteína, já que se pode deduzir a massa das proteínas

de cada banda do gel por comparação da migração com padrões de massa molecular conhecida, também aplicados no gel.

No procedimento realizado, as células foram então lisadas através de sonificação e as proteínas separadas por SDS-PAGE. A figura 1 mostra um gel de SDS-PAGE realizado após lise de bactérias transformadas com uma concentração de IPTG de 1mM, crescendo a 30°C.

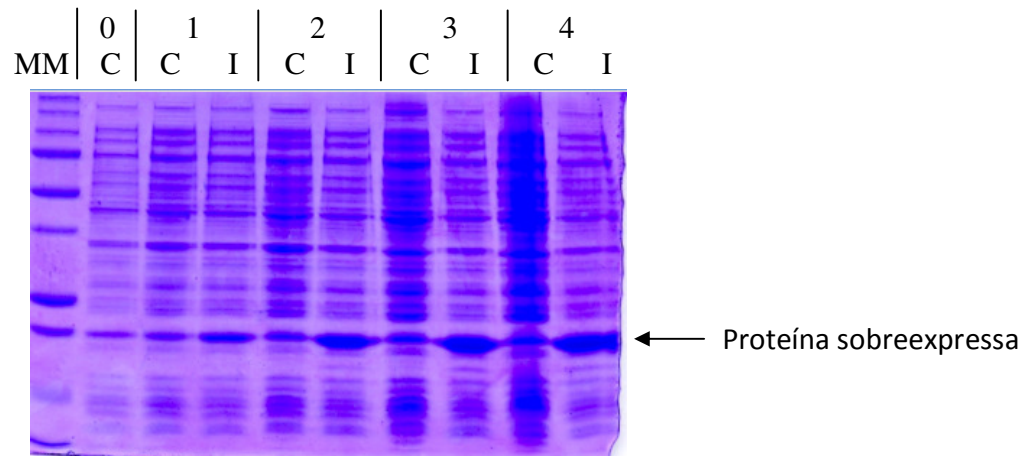


Figura 1 – resultado da aplicação da técnica de electroforese SDS-PAGE ao lisado de *E. Coli* transformada. Os números referem-se ao tempo em que foram recolhidas as bactérias após serem colocadas a crescer (em horas). ‘C’ refere-se aos controlos (sem IPTG); ‘I’ refere-se às culturas em que a expressão foi induzida, com IPTG 1mM. ‘MM’ corresponde aos marcadores de massa molecular.

Analisando a figura, observa-se claramente que quanto mais tempo as células se encontram no meio de cultura a crescer, maior é a quantidade de proteína expressa, sendo máxima após 4h de crescimento bacteriano. Para além disso, nas culturas cuja expressão foi induzida, é claro o aparecimento de uma banda que se destaca de todas as outras, correspondente proteína a ser expressa. Também a temperatura afecta a expressão proteica, sendo que a 37°C esta é superior. Em relação às concentrações de IPTG utilizadas, os resultados foram essencialmente idênticos. Foram assim encontradas as melhores para a produção da proteína em causa.

Seguidamente, como pretendemos obter uma quantidade elevada de glioxalase II para ser utilizado nos variados ensaios que se seguem, procedeu-se ao cultivo em massa de *E. Coli* transformada com o gene do glioxalase II.

Note-se que as bactérias carecem em mecanismos que induzem a conformação correcta de uma proteína. Como tal, é possível que haja a exposição de resíduos hidrófobos por parte das proteínas, que levam à sua agregação, e consequente formação de estruturas insolúveis denominadas corpos de inclusão, principalmente em proteínas não endógenas⁶. Desta forma, após a lise das células, foi necessário saber se a proteína se encontrava precipitada, em corpos de inclusão (insolúvel) ou soluvel. Para

separar as fracções, procedeu-se a uma centrifugação, separando-se o material que precipita (*Pellet*) do que está solúvel e as diferentes fracções foram aplicadas num novo gel de electroforese (figura 2).

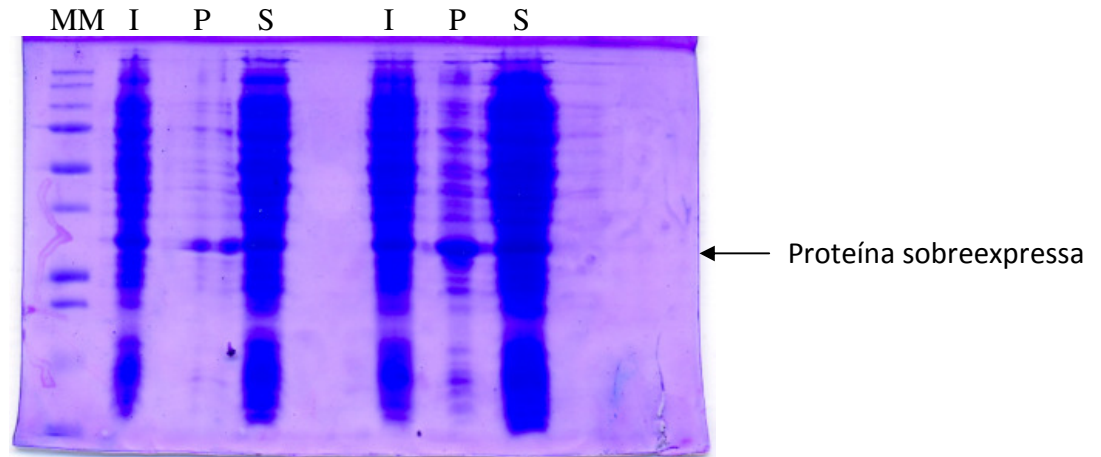


Figura 2 – Fracções obtidas após lise das células: 'I': Inicial (Sobrenadante + precipitado); 'P': *Pellet*; 'S': sobrenadante. No grupo de amostras da direita, introduziu-se o dobro da quantidade de amostra.

Analisando a figura 2, é evidente a forte presença de glioalase II precipitado, mas também se pode observar que no sobrenadante existe uma quantidade considerável deste enzima. Para prosseguir os estudos foi utilizada a proteína solúvel porque esta estará com uma conformação nativa ao contrário da proteína que se encontra a formar corpos de inclusão.

É ainda necessário proceder a uma purificação deste extracto (segundo objectivo proposto).

2. Purificação do hidrolisado através de cromatografia de afinidade

Aquando da transformação, é possível adicionar à sequência do DNA correspondente à proteína uma sequência que lhe confere uma propriedade particular (denominado *TAG*).

Neste caso, foi adicionado um fragmento de seis Histidinas à proteína dita normal. Os seis resíduos de histidina ligam-se especificamente a iões Níquel através dos grupos amina das respectivas cadeias laterais, formando um ião complexo de estrutura octaédrica⁷. Isto permite então uma ligação estável das proteínas aos iões Níquel, que pode ser desfeita com a adição de imidazole. Deste modo, é possível fazer a amostra passar por um suporte sólido contendo Níquel, permanecendo agregada a este, enquanto que as restantes proteínas não. Removendo as restantes proteínas da solução (através de sucessivas lavagens), purificamos a amostra, numa técnica denominada cromatografia de afinidade. Os resultados são apresentados na figura 3.

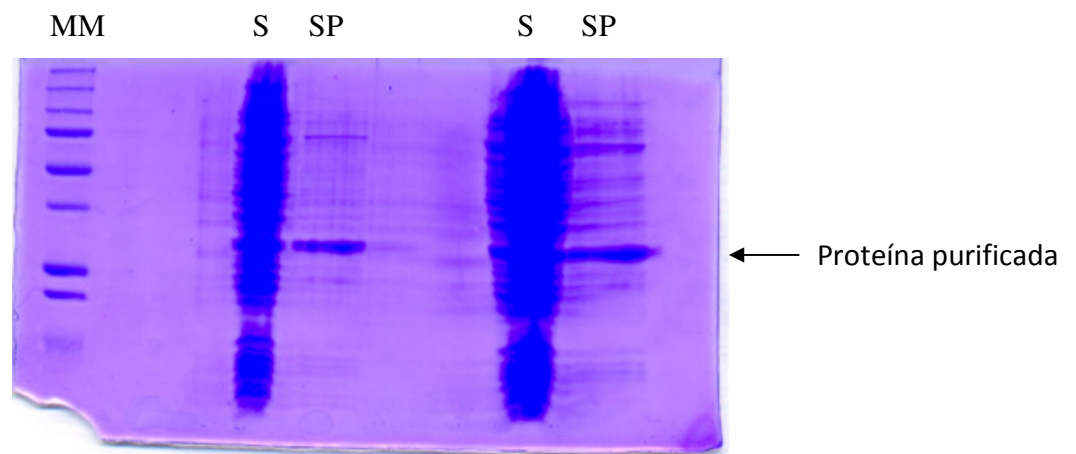


Figura 3 – Purificação do sobrenadante obtido após lise das bactérias. ‘S’: sobrenadante bruto; ‘SP’: sobrenadante sujeito a purificação por cromatografia de afinidade. No grupo de amostras da direita, introduziu-se o dobro da quantidade de amostra.

Este passo de purificação foi muito bem sucedido. Considerando que o mesmo volume de hidrolisado foi utilizado nas respectivas fracções ‘S’ e ‘SP’, a remoção de outras proteínas que não a glicoxalase II é evidente. A banda que permanece bastante marcada na fracção purificada pertencerá então a esta enzima. Procedemos então à quantificação proteica do hidrolisado purificado recorrendo ao método de Bradford, um método espectroscópico, cujo corante adopta uma tonalidade azul na presença de proteínas. O valor obtido foi de 0,2073 mg/mL, o que é um valor bastante satisfatório tendo em conta que existe quantidade de proteína suficiente para a aplicação da técnica de espectrometria de massa. Procedeu-se, assim, a nova purificação por cromatografia de afinidade, efectuando-se várias eluições da proteína (figura 4).

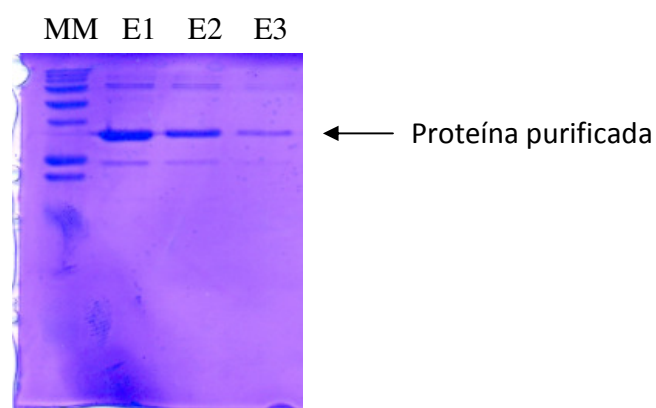


Figura 4 – Nova purificação do sobrenadante obtido após lise das bactérias. ‘E’ 1,2,3: Sucessivas eluições da proteína a partir do suporte sólido.

3. Aplicação da técnica de PMF (*peptide mass fingerprinting*) para confirmar a presença de glioxalase II

As bandas obtidas num gel de SDS-PAGE podem ser retiradas deste, podendo-se identificar, com mais rigor, qual a proteína presente nessa banda (terceiro objectivo proposto). Isto é feito recorrendo-se a espectrometria de massa, a qual separa os vários componentes de uma mistura de acordo com a sua massa, fornecendo um valor bastante viável desta.

Neste caso, utilizámos uma técnica, *peptide mass fingerprinting* (PMF), que consiste na hidrólise da proteína com um protease específico nos péptidos correspondentes e comparação das massas obtidas com as massas previstas para a digestão teórica da proteína com o mesmo enzima. Existem actualmente softwares específicos que comparam as massas obtidas experimentalmente por espectrometria de massa com as sequências depositadas em base de dados. À medida que a sequenciação de genomas aumenta, as sequências depositadas em base de dados também aumentam e esta técnica torna-se cada vez mais útil. O espectro de massa obtido é apresentado na figura 5.

De forma a controlar o método, utilizou-se uma proteína já bastante estudada, a albumina sérica bovina (BSA). Como os resultados (figura 5A) mostram uma correlação quase exacta com a teoria (disponível em www.expasy.ch), analisámos então os resultados obtidos para o glioxalase II.

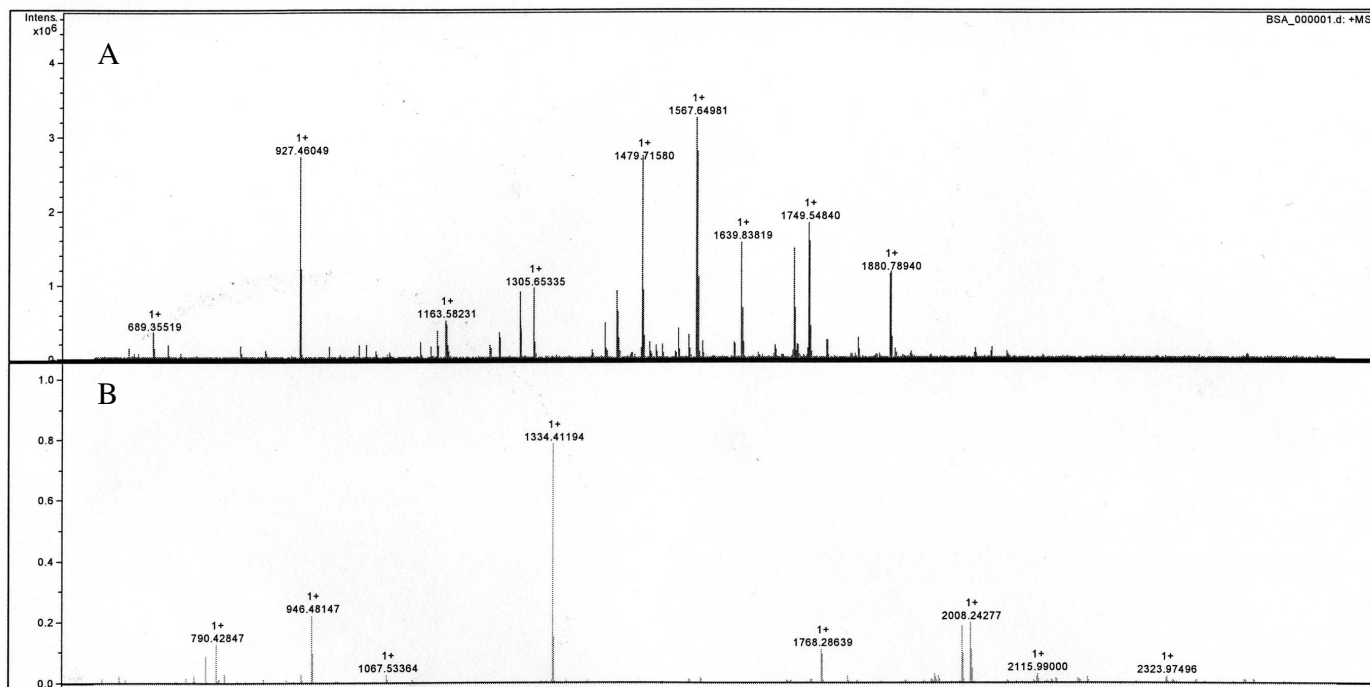


Figura 5 – Espectro de massa dos péptidos obtidos após hidrólise de (A) BSA comercial e (B) glioxalase II

Quadro 1 – Razões massa/carga dos péptidos após hidrólise de glioxalase II e valores teóricos, organizados por ordem de intensidades no espectro. A vermelho encontram-se massas não correspondentes ao glioxalase II, pelo que se tratarão de proteínas contaminantes.

m/z experimental	m/z teórico correspondente	Modificação
1334,41194	1334,66990	
946,48147	946,55810	
2008,24277	-	
1334,39046	1334,66990	
1994,23837	1994,99630	Cys_CAM: 138
790,42847	790,45700	
1768,28639	-	
773,40622	-	
2115,99000	2116,87070	Cys_CAM: 294
1950,24897	1950,96680	

De facto, os picos mais intensos obtidos correspondem, como esperado, ao teórico correspondente a esta enzima, de *leishmania infantum*. No entanto, existem algumas massas de péptidos no espectro não correspondentes a esta enzima, indicando a presença de algumas proteínas contaminantes, mas que não impedem a correcta identificação da proteína em foco.

4. Optimização do método para análise estrutural da estrutura terciária do glioxalase II através de PMF

Finda a identificação da presença de glioxalase II no hidrolisado de bactéria (após purificação), procedemos ao desenvolvimento de um método inovador para análise estrutural de proteínas por espectrometria de massa. De facto, as proteínas apresentam geralmente, e na forma nativa, uma estrutura globular (muitas vezes aproximada a uma forma esférica). Desta forma, pretendemos otimizar as condições em que as submetemos a proteólise controlada, de forma a determinar por esta técnica quais os péptidos que se encontram mais exteriormente e, de seguida, quais os mais interiores. O protocolo foi desenhado de forma a manter sempre uma estrutura não desnaturada da proteína, e encontra-se descrito no anexo I. De seguida, após a adição de protease, fizeram-se recolhas de hidrolisado a diferentes tempos, podendo-se, teoricamente, ver o “aparecimento” de novos péptidos no espectro correspondentes a um tempo superior de exposição ao protease.

Este método de determinar a estrutura de uma proteína com base em que péptidos são hidrolisados primeiro é uma alternativa muito mais rápida que os métodos

tradicionais de análise estrutural, como a cristalografia de raios X ou o NMR, podendo-se conhecer a estrutura do enzima quando as técnicas acima referidas ainda não foram aplicadas (vale a pena lembrar que apenas uma pequena percentagem das proteínas descobertas até hoje viu a sua estrutura completamente descodificada). Oferece ainda a grande vantagem de se identificar se uma proteína está desnaturada ou não e, caso esteja, qual foi a alteração conformacional desta (que péptidos da proteína foram orientados para fora e vice-versa, após desnaturação). No entanto, esta técnica requer que o genoma do organismo-fonte da proteína esteja completamente sequenciado, neste caso, o genoma do parasita *leishmania infantum*.

Assim, procedeu-se à realização deste método inicialmente nas proteínas lisozima e BSA. Isto para que provássemos que esta análise é viável e coerente, já que podemos comparar os resultados obtidos com a estrutura destas proteínas já conhecida na literatura.

No entanto, não foi possível terminar a optimização das condições em que é feita esta hidrólise, mas este será um objectivo que continuará a ser explorado pelo aluno e pelo próprio grupo de enzimologia.

Conclusões e apreciação global

Apesar de apenas os objectivos de 1 a 3 terem sido cumpridos (cuja descrição se encontra no enunciado do projecto), este projecto foi determinante para aprender que técnicas são utilizadas hoje em investigação na área de proteómica. Foi também possível começar a discernir qual a melhor forma de chegar à resolução de um problema, de forma a cumprir os objectivos, e nisto incluem-se a criação de protocolos experimentais próprios, tornando-me num melhor investigador e com melhor capacidade de desenvolver um novo projecto no futuro, possivelmente no próprio grupo de enzimologia.

A apresentação do projecto no Fórum será feita em PowerPoint.

Anexos

Anexo I

Protocolo para hidrólise de BSA em solução em condições não desnaturantes

1. Introduzir em 8 tubos eppendorf 10 µL de solução BSA 1mg/mL preparada em tampão NH_4HCO_3 50mM
2. Adicionar 15 µL de tampão NH_4HCO_3 50mM a cada tubo
3. Colocar 5 µL de tripsina 0,02 µg/µL
4. Colocar os tubos num banho a 37°C

5. Em intervalos de 30 em 30 minutos, retirar um dos tubos do banho e colocar a - 20°C e forma a parar a reacção
6. Realizar MALDI-MS (*matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*) para observação dos péptidos obtidos

Bibliografia

1. Gomes, R., Sousa Silva, M., Vicente Miranda, H. , Ferreira, A.E.N., Cordeiro, C., Ponces Freire, A. (2005). *Protein glycation in Saccharomyces cerevisiae: Argpyrimidine formation and methylglyoxal catabolism*. FEBS Journal , 272(17): 4521-4531
2. Sousa Silva, M. , Ferreira, A.E.N., Tomás, A.M., Cordeiro, C., Ponces Freire, A. (2005). *Quantitative assessment of the glyoxalase pathway in Leishmania infantum as a therapeutic target by modelling and computer simulation*. FEBS Journal 272(10): 2388-2398
3. Ponces-Freire, A., Ferreira, A.E., Gomes, R. and Cordeiro, C. (2003). *Antiglycation defences in yeast*. Biochem. Soc. Trans. 31 : 1409-1412
4. Kamp, R.M., Choli-Papadopoulou, T., Wittmann-Liebold, B. Protein Structure Analysis: preparation, characterization and microsequencing. Heidelberg: Springer, 1997.
5. Thornalley PJ. *Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems-role in ageing and disease*. Drug Metabol Drug Interact. 2008;23(1-2):125-50.
6. http://en.wikipedia.org/wiki/Inclusion_bodies
7. http://www.mnstate.edu/provost/His_TagNiChromatogProtocol.pdf